大豆低聚糖及其功能组分对体外条件下肉仔鸡盲肠内容物粪臭素产量及菌群组成的影响

杨桂芹　杨　航　刘吉喆　刘海英　董维国　朱　鑫

（沈阳农业大学畜牧兽医学院，沈阳　110866）

摘　要：本试验旨在研究大豆低聚糖（SBO）及其功能组分对体外条件下肉仔鸡盲肠内容物粪臭素产量及盲肠菌群组成的影响。试验采用单因素完全随机设计，以 42 日龄肉仔鸡盲肠内容物为菌源，将厌氧培养液分装于无菌培养瓶中，分成 5 个组，每组 3 个重复。对照组添加 250 μmol/L 的 *L*-色氨酸，蔗糖（SUC）、水苏糖（STA）、棉子糖（RAF）和 SBO 组分别在对照组的基础上添加 1%的 SUC、STA、RAF 和 SBO。另外，每组均设 1 个不加 *L*-色氨酸、但其他成分都相同的空白对照。利用 ANKOM RFS 体外产气系统，39 ℃厌氧培养 24 h。结果表明：1）SUC、STA、SBO 组 24 h 发酵液累积产气量极显著高于对照组和 RAF 组（$P<0.01$）；SBO、SUC 和 STA 组吲哚浓度分别比对照组降低了 98.15%、97.72%和 94.17%（$P<0.01$），粪臭素浓度分别比对照组降低了 79.04%、71.88%和 70.28%（$P<0.05$）；SUC 组乳酸浓度极显著高于其他各组（$P<0.01$）；对照组 pH 极显著高于除 RAF 组之外的其他各组（$P<0.01$）。2）采用 PCR-变性梯度胶凝电泳（DGGE）技术研究了发酵液菌群组成的差异。SBO 组菌群均匀度显著低于对照组（$P<0.05$）；SUC、STA、RAF、SBO 组菌群丰富度显著高于对照组（$P<0.05$）；SBO、STA、RAF 组菌群相似性高于对照组；试验组有 3 条特异性条带，相似菌分别为延长布劳特氏菌（*Blautia producta*）、迪氏副拟杆菌（*Parabacteroides distasonis*）、路氏乳杆菌（*Lactobacillus reuteri*）。综上，在本试验条件下，添加 1%的 SUC、STA 和 SBO 显著降低了肉仔鸡体外盲肠内容物培养液中 *L*-色氨酸代谢生成吲哚和粪臭素的浓度，提高了菌群丰富度，并促进了特异性菌的增殖。降低粪臭素效果优劣依次为：SBO>SUC>STA。

关键词：粪臭素；大豆低聚糖；盲肠菌群；体外发酵；肉仔鸡

中图分类号：S831.5　　　　文献标识码：A　　　　文章编号：

我国肉鸡业发展迅速且规模不断扩大，与此同时，鸡场排出的大量粪便所产生的臭气对环境的污染也不断加剧。通过营养学技术从根源上减少养鸡业的臭气污染，越来越引起人们的广泛关注[1]，对促进肉鸡业持续、健康发展和探索环境友好型畜牧业具有重要科学意义。粪臭素是微生物降解 *L*–

收稿日期：2017-04-09

基金项目：国家自然科学基金项目（31372328）

作者简介：杨桂芹（1966—），女，辽宁凌源人，教授，博士，从事家禽营养与饲料科学研究。E-mail: guiqiny@126.com

色氨酸（*L*-ptophan，*L*-Try）的代谢产物，是引起猪鸡排泄物产生恶臭的主要物质之一[2-3]。研究表明，*L*-Try 的可利用度和肠道微生物的组成和活力是影响动物肠道粪臭素浓度的主要因素[4]。肉仔鸡盲肠粪臭素浓度显著高于回肠和直肠，其浓度差异主要与肠道菌群多样性和丰富度有关[5]。大豆低聚糖（SBO）是以大豆及其加工副产品为原料生产的、含有一定量的水苏糖（STA）、棉子糖（RAF）和蔗糖（SUC）等低聚糖的产品（GB/T 22491—2008）。一般 75%的 SBO 中，含 18% STA、6% RAF、24% SUC[6]。Coon 等[7]报道，火鸡对 RAF 和 STA 的回肠消化率不足 1%，但排泄物消化率高达 84%～90%，进一步说明了 SBO 及其功能组分主要在禽类后肠道被微生物利用。Li 等[8]研究了不同纤维源在猪直肠菌群作用下对 *L*-Try 体外代谢的影响，结果表明体外培养体系中粪臭素的产生受到直肠微生物组成的影响，而后者与纤维物质的来源密切相关。盛清凯等[9]研究表明，外源 *L*-Try 是猪粪体外发酵液中色氨酸和粪臭素的主要影响因素。本课题组前期研究表明，饲粮添加 SBO 显著降低了 42 日龄肉仔鸡排泄物吲哚和粪臭素的浓度[10]，显著降低了在肉仔鸡盲肠和直肠菌群作用下 *L*-Try 代谢生成粪臭素的浓度[11]，但何种单一聚合度（单体组分）的 SBO 在其中起主要作用还不完全清楚，其作用机制也有待于进一步阐明。

1 材料与方法

1.1 试验材料及样品采集

试验用的 SBO、SUC、RAF、STA 均为市售商品低聚糖，由河南某生物科技有限公司生产。采用蒽酮比色法[12]，实测 SBO、SUC、RAF、STA 的总糖含量分别为 76.10%、64.53%、68.21%和 88.07%。爱拨益加（AA）肉仔鸡饲养至 42 日龄时，选取 30 只健康鸡只（饲喂玉米–豆粕型无抗生素饲粮，公母各占 1/2），平均体重为 2.75 kg；宰杀，剖开腹腔，分离盲肠，用细线结扎，剪下，装入事先准备好的自封袋中，称重（每只鸡约 6～7 g 盲肠内容物），迅速置–80 ℃冰箱备用。

1.2 试验设计

采用单因素完全随机试验设计，分别设 SUC、STA、RAF、SBO 和对照组，每组 3 个重复。对照组添加 250 μmol/L 的 *L*-Try，SUC、STA、RAF 和 SBO 组分别在对照组的基础上添加 3.10 g SUC、2.27 g STA、2.93 g RAF、2.63 g SBO（以总糖含量计为 1%），体外培养液体积为 200 mL。另外，考虑到不同底物原料蛋白质含量的差异，每组均设 1 个不加 *L*-Try、但其他成分都相同的空白对照，其结果用于对吲哚和粪臭素浓度进行校正。

1.3 体外培养液的配制及发酵

参照 Yokoyama 等[13]的方法，配制基础培养液。调整 pH 至 5.7±0.3（鸡的盲肠内容物 pH 为 5.7）；然后，在 1 个标准大气压、121 ℃条件下灭菌 15 min[14]；将盲肠内容物从–80 ℃冰箱取出，置超净工作台解冻，按照公母肉鸡盲肠内容物样品 1:1 混合后，称取 30 g，悬浮于 3 L 无菌厌氧培养液中。充分搅拌后用 4 层纱布过滤以除去粗微粒物质，并将滤液分装到 ANKOM RFS 无菌培养瓶中，每瓶 198 mL，操作全程开通 CO_2 以保证菌群的活性。在各组培养液中添加 2 mL 5.1 mg/mL 的 *L*-Try（*L*-Try 添加终浓度为 250 μmol/L），试验组再分别添加 1%的 SUC、STA、RAF 和 SBO，空白对照组添加 2 mL 的无菌蒸馏水，充分震荡混匀。将培养瓶中通满 CO_2，盖上产气系统的密封盖并拧紧，放入 39 ℃恒温培养箱中，厌氧培养 24 h。用带盖离心管留取部分发酵液分别至–20 ℃和–80 ℃冻存备用。

1.4 发酵液产气量、粪臭素浓度和发酵参数测定

1.4.1 产气量

ANKOM RFS 体外产气系统能自动检测产气瓶中产生的气体，并且记录气压信息。根据公式，将气压信息换算成产生气体的体积（mL）。

$$Vx_t = Vj \times (Ppsi_t - Ppsi_0) \times 0.068$$。

式中：Vx_t 为 t（h）时刻产生气体的体积（mL）；Vj 为模块瓶内液面上部空间的体积（mL）；$Ppsi_t$ 为 t（h）时刻样本模块瓶 GPM 软件记录的累积压力（psi）；$Ppsi_0$ 为 t（h）时刻空白模块瓶 GPM 软件记录的累积压力（psi）。1 psi=6.895 KPa。

1.4.2 pH

厌氧培养结束后，用校正的 PHS-3C 型 pH 计测定发酵液的 pH。

1.4.3 吲哚和粪臭素浓度

参照文献[11]的方法，用 Agilen-1100 型高效液相色谱仪测定发酵液的吲哚和粪臭素浓度。

1.4.4 乙酸、丙酸、丁酸和乳酸浓度

参照文献[15]的方法，用 Agilent-7890B 气相色谱仪测定发酵液的乙酸、丙酸、丁酸和乳酸浓度。

1.5 发酵液菌群结构测定

1.5.1 基因组 DNA 的提取

使用十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）环境微生物 DNA 提取试剂盒，提取发酵液中总细菌基因组 DNA，并用 DNA 纯化试剂盒进行纯化，置–20 ℃保存备用。

1.5.2 细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增

细菌通用引物同文献[10]。PCR 扩增体系（50 μL）：rTaq 酶（5 U/μL）0.4 μL；10×PCR buffer 5 μL；dNTP（2.5 mmol/L）3.2 μL；GC-338F（20 μmol/L）1 μL；518R（20 μmol/L）1 μL；模板 DNA 50 ng；补 ddH_2O 至 50 μL。反应条件：94 ℃ 5 min；94 ℃ 1 min，55 ℃ 45 s，72 ℃ 1 min，30 个循环；最终 72 ℃延伸 10 min。

1.5.3 变性梯度凝胶电泳（DGGE）分析

采用 Bio-Rad Dcode 系统进行 DGGE 分析。采用变性梯度为 35%～55%、浓度为 7%的聚丙烯酰胺凝胶在 1×TAE、150 V、60 ℃下电泳 5 h。采用硝酸银染色并用凝胶成像系统拍照记录。采用 Poly-Gel DNA 提取试剂盒（OMEGA）回收目的条带，并进行克隆测序。测定序列在 GenBank 数据库中进行比对分析，寻找亲缘关系最近的细菌或克隆。

1.5.4 PCR-DGGE 图谱分析

采用 Quantity one 软件对图谱条带数目、密度进行数字化分析，其计算公式如下所示：

$$H=-\sum_{i=1}^{s} pi\ln pi=-\sum_{i=1}^{S}(Ni/N)\ln(Ni/N)；$$

$$E=\frac{H}{H\max}=\frac{H}{\ln S}。$$

式中，H、S 和 E 分别代表多样性指数[香农–威纳指数（Shannon-Wiener index）]、丰富度和均匀度。pi 为样品中单一条带的光密度值在该样品所有条带光密度总值中所占的比率；N 为 DGGE 图谱单一泳道上条带的丰度；Ni 为第 i 泳道条带的丰度；S 是全部样品中所有条带数目总和；Hmax 为 H 的最大值。

不同样品间菌群差异的两两比较，依据戴斯相似系数（Dice coefficient，Cs），用 MEGA 4.1 软件进行聚类分析。Cs 的计算公式为：

$$Cs=\frac{2j}{Nx+Ny}。$$

式中，Nx 为 x 泳道样本的条带数，Ny 为 y 泳道样本的条带数，j 为两个泳道共有的条带数。

1.6 数据统计与分析

数据采用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件进行单因素方差分析，Duncan 氏法进行多重比较。粪臭素浓度、发酵参数、菌群结构之间采用双变量相关分析。$P<0.05$ 为差异显著，$P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 发酵液累积产气量

由表 1 可知，发酵至 3 h，各组发酵液累积产气量差异显著（P<0.05），之后各阶段各组累积产气量差异极显著（P<0.01）；发酵至 6、9 h 时，RAF 组累积产气量极显著低于对照组（P<0.01）；发酵至 21 h 之前，RAF 组累积产气量均低于对照组，但差异不显著（P>0.05）；发酵至 24 h 时，SUC、STA、SBO 组累积产气量极显著高于对照组和 RAF 组（P<0.01），对照组累积产气量最低。各阶段 SUC、STA、SBO 组之间累积产气量差异不显著（P>0.05）。由图 1 可直观看出各阶段各组累积产气量的变化情况。

表1 大豆低聚糖及其功能组分在肉仔鸡盲肠菌群作用下对发酵液累积产气量的影响

Table 1 Effects of soybean oligosaccharide and its functional components on cumulative gas production in fermentation broth by cecal microbiota of broilers mL

组别 Groups	发酵时间 Incubation time/h							
	3	6	9	12	15	18	21	24
蔗糖 SUC	37.79±3.10^{ab}	61.15±4.77^{Aa}	85.72±6.18^{Aa}	112.55±11.08^{Aa}	134.49±12.90^{Aa}	149.22±13.49^{Aa}	160.76±11.77^{Aa}	171.73±9.62^{Aa}
水苏糖 STA	37.89±1.22^{ab}	54.96±1.26^{ABa}	77.47±2.38^{ABab}	104.11±6.57^{Aa}	131.02±6.88^{Aa}	147.44±6.01^{Aa}	158.04±5.96^{Aa}	168.17±7.71^{Aa}
棉子糖 RAF	33.10±1.31^{b}	40.70±1.48^{Bb}	46.05±1.53^{Cd}	50.83±1.94^{Cb}	57.68±3.56^{Bb}	65.18±5.26^{Bb}	77.47±6.63^{Bb}	96.88±7.66^{Bb}
大豆低聚糖 SBO	42.95±2.64^{a}	56.27±3.63^{Aa}	73.72±1.57^{ABbc}	98.67±6.02^{ABa}	118.45±11.97^{Aa}	131.78±13.11^{Aa}	142.65±13.63^{Aa}	152.60±13.33^{Aa}
对照 Control	44.60±1.55^{a}	55.85±1.55^{Aa}	63.45±2.11^{Bc}	68.65±1.97^{BCb}	72.73±2.11^{Bb}	76.25±2.53^{Bb}	78.78±1.97^{Bb}	82.30±1.55^{Bb}
标准误 SEM	1.38	2.28	4.10	7.06	9.44	10.60	10.86	10.59
P 值 P-value	0.038	0.009	＜0.001	0.001	0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

同列数据肩标相同或无字母表示差异不显著（P>0.05），不同小写字母表示差异显著（P<0.05），不同大写字母表示差异极显著（P<0.01）。下表同。

In the same column, values with the same or no letter superscripts mean no significant difference (P>0.05), and with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05), while with different capital letter superscripts mean extremely significant difference (P<0.01). The same as below.

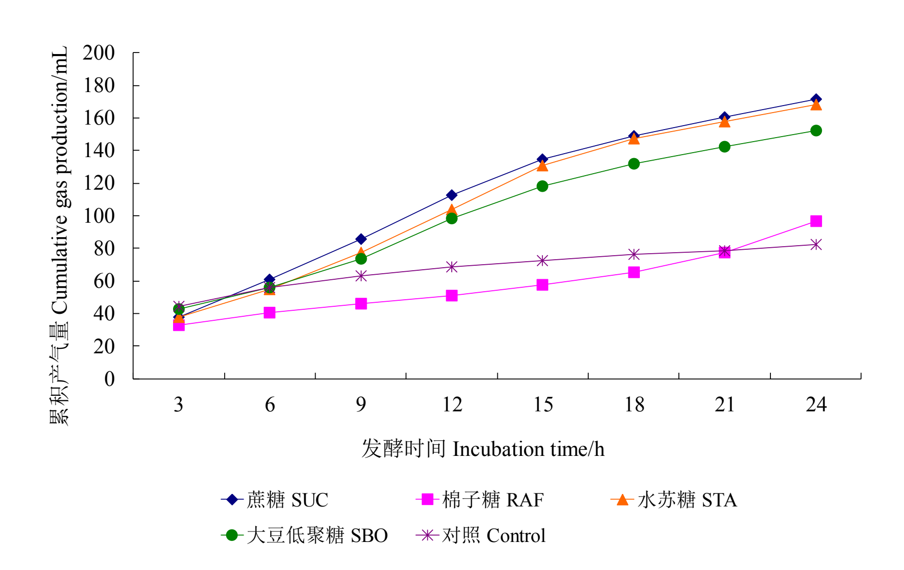


图1 大豆低聚糖及其功能组分在肉仔鸡盲肠菌群作用下对发酵液累积产气量的影响

Fig.1 Effects of soybean oligosaccharide and its functional components on cumulative gas production in fermentation broth by cecal microbiota of broilers

2.2 发酵液吲哚、粪臭素浓度及发酵参数

由表2可知，SBO、SUC和STA组发酵液中的吲哚浓度分别比对照组降低了98.15%、97.72%和94.17%（P<0.01），但SUC、STA和SBO组的吲哚浓度差异不显著（P>0.05），RAF组的吲哚浓度与对照组相比差异不显著（P>0.05）。各组发酵液中的粪臭素浓度显著低于对照组（P<0.05），其中，SBO、SUC、STA和RAF组的粪臭素浓度分别比对照组降低了79.04%、71.88%、70.28%和62.42%（P<0.05），但SBO、SUC、STA和RAF组的粪臭素浓度差异不显著（P>0.05）。各组发酵液中的乙酸浓度差异不显著（P>0.05）。SUC组发酵液中的乳酸浓度极显著高于其他各组（P<0.01），RAF、SBO组的乳酸浓度与对照组相比差异不显著（P>0.05）。对照组发酵液的pH极显著高于除RAF组之外的其他各组（P<0.01）。

表2 大豆低聚糖及其功能组分在肉仔鸡盲肠菌群作用下对发酵液吲哚、粪臭素浓度及发酵参数的影响

Table 2 Effects of soybean oligosaccharide and its functional components on indole, skatole concentrations and fermentation parameters in fermentation broth by cecal microbiota of broilers

组别 Groups	吲哚 Indole/(ng/mL)	粪臭素 Skatole/(ng/mL)	乙酸 Acetic acid/(mmol/L)	乳酸 Lactic acid/(mmol/L)	pH
蔗糖 SUC	5.21±0.29^{Bb}	8.05±0.73^{b}	16.88±0.47	17.51±1.00^{Aa}	5.65±0.49^{BCbc}

水苏糖 STA	13.33 ± 1.20^{Bb}	8.51 ± 0.81^{b}	16.32 ± 0.57	7.25 ± 0.65^{Bb}	5.33 ± 0.06^{BCc}
棉子糖 RAF	225.72 ± 13.89^{Aa}	10.76 ± 1.96^{b}	17.62 ± 3.09	4.25 ± 0.33^{BCc}	6.53 ± 0.10^{ABab}
大豆低聚糖 SBO	4.22 ± 0.70^{Bb}	6.00 ± 0.63^{b}	14.60 ± 0.26	3.62 ± 0.12^{Cc}	4.89 ± 0.42^{Cc}
对照 Control	228.48 ± 21.95^{Aa}	28.63 ± 9.85^{a}	10.27 ± 0.73	4.30 ± 0.73^{BCc}	7.46 ± 0.22^{Aa}
标准误 SEM	29.09	2.79	0.88	1.50	0.27
P 值 *P*-values	＜0.001	0.031	0.089	＜0.001	0.001

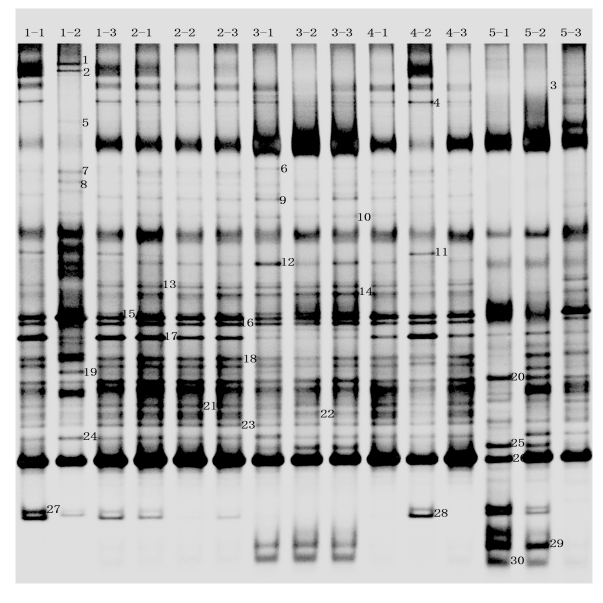
各组发酵液中丙酸和丁酸均未检出。

No propionate and butyrate were detected in fermentation broth in all groups.

2.3 发酵液菌群组成

2.3.1 菌群多样性

由图 2 可知，12、20、25、26 号条带在各组中均存在。有部分条带只在某个组中存在，有部分条带只在某个组中未出现。由表 3 可知，各组发酵液中菌群多样性指数差异不显著($P>0.05$)；SBO 组发酵液中菌群均匀度显著低于对照组（$P<0.05$）；SUC、STA、RAF、SBO 组发酵液中菌群丰富度均显著高于对照组（$P<0.05$）。



1-1，1-2，1-3 为蔗糖组；2-1，2-2，2-3 为水苏糖组；3-1，3-2，3-3 为棉子糖组；4-1，4-2，4-3 为大豆低聚糖组；5-1，5-2，5-3 为对照组。图 3 同。

1-1, 1-2, 1-3 were SUC groups; 2-1, 2-2, 2-3 were STA groups; 3-1, 3-2, 3-3 were RAF groups; 4-1, 4-2, 4-3 were SBO groups; 5-1, 5-2, 5-3 were control groups. The same as Fig.3.

图 2　发酵液菌群 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig.2　PCR-DGGE fingerprints of microbiota in fermentation broth

表 3　大豆低聚糖及其功能组分对体外条件下肉仔鸡盲肠菌群多样性的影响

Table 3　Effects of soybean oligosaccharide and its functional components on the cecal microbiota diversity of broilers *in vitro*

组别 Groups	多样性指数 Shannon-wiener index	均匀度 Evenness	丰富度 Richness
蔗糖 SUC	3.03±0.03	0.968±0.004[ab]	23.00±0.58[a]
水苏糖 STA	3.07±0.05	0.966±0.002[ab]	24.00±1.15[a]
棉子糖 RAF	3.13±0.04	0.968±0.008[ab]	25.33±0.67[a]
大豆低聚糖 SBO	3.00±0.03	0.957±0.003[b]	23.00±0.58[a]
对照 Control	2.85±0.11	0.977±0.009[a]	18.67±2.03[b]
标准误 SEM	0.030	0.004	0.740
P 值 *P*-values	0.065	0.023	0.021

2.3.2　菌群相似性

由图3可知，图谱条带被明显分成两簇，两簇之间相似性系数为0.49。上方簇为2个对照组样品和1个RAF组样品，相似性系数为0.68，而2个对照组样品之间的相似性系数为0.76。下方簇中，与其他样品相似性系数最低的为SUC组样品1-2，仅为0.51；而对照组样品5-3与其他样品的相似性系数为0.64，明显低于其他3组；相似性高的有4簇，分别为SBO组样品4-1和样品4-3、STA组样品2-2和样品2-3、RAF组样品3-1和样品3-3、SUC组样品1-1和SBO组样品4-2，相似性系数依次为0.89、0.88、0.84、0.84，这些样品为添加了SBO、STA、RAF的组，相似性系数均高于对照组。

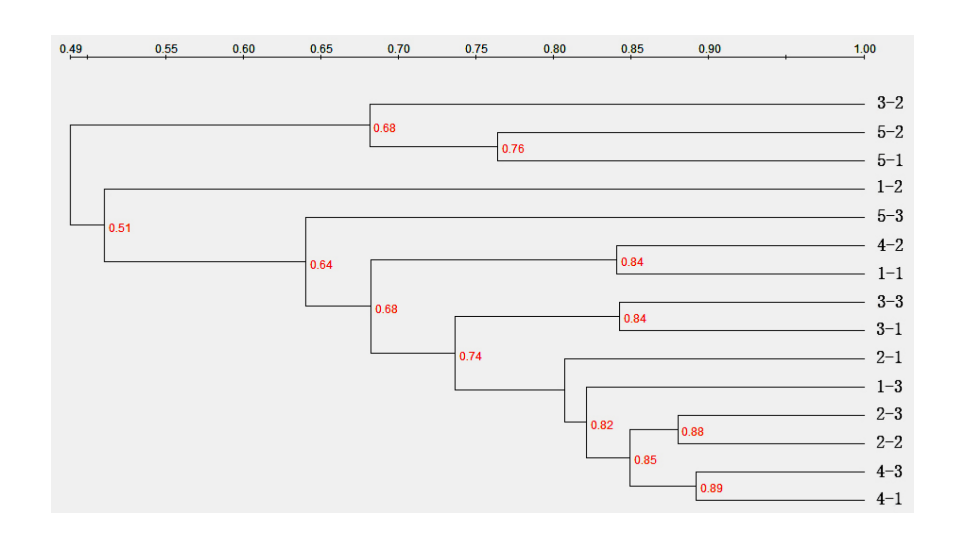


图 3　15 个发酵液样品的未加权配对组法聚类分析

Fig.3　Unweighted pair group method clustering analysis of 15 fermentation broth samples

2.3.3　菌群 PCR-DGGE 指纹图谱优势条带序列

本试验对 PCR-DGGE 指纹图谱中 11 条具有共性、特异性的条带进行了回收、克隆和测序。由表 4 可知，在 11 个测序结果中，与 GenBank 数据库中细菌的相似度都在 99%～100%。其中 12、20、25、26 号条带为 15 个发酵液样品的共有条带，其相似菌分别为鹑鸡肠球菌（*Enterococcus gallinarum*）、肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*）、菊花迪克氏菌（*Dickeya chrysanthemi*）、宋内氏志贺氏菌（*Shigella sonnei*）。4 号条带仅在 RAF 组样品 3-1 中出现，其相似菌为延长布劳特氏菌（*Blautia producta*）。9 号条带在 SUC 组样品 1-1、1-2，STA 组样品 2-1、2-3，RAF 组所有样品和 SBO 组样品 4-1、4-2 中出现，其相似菌为迪氏副拟杆菌（*Parabacteroides distasonis*）。28 号条带在 SUC、STA、RAF 和 SBO 组中出现，相似菌为路氏乳杆菌（*Lactobacillus reuteri*）。可见，条带 4、9、28 号条带仅在试验组中出现。

表 4　PCR-DGGE 凝胶条带回收序列分析结果

Table 4　Analysis results of PCR-DGGE gel bands recovery sequence

条带号 Band numbers	相似菌 Similar strain	登录号 Accession numbers	相似度 Similarity/%	分类 Classification	备注 Note
4	延长布劳特氏菌 *Blautia producta*	NR_113270	100	厚壁菌门 Firmicutes 梭菌纲 Clostridia 布劳特氏菌属 *Blautia*	RAF 组 3-1 特有
9	迪氏副拟杆菌 *Parabacteroides distasonis*	NR_041342	99	拟杆菌门 Bacteroidetes 拟杆菌纲 Bacteroidia 副拟杆菌属 *Parabacteroides*	SUC 组 1-1、1-2，STA 组 2-1、2-3，RAF 组和 SBO 组

					4-1、4-2 共有
12	鹑鸡肠球菌 *Enterococcus gallinarum*	NR_104559	99	厚壁菌门 Firmicutes 芽孢杆菌纲 Bacilli 肠球菌属 *Enterococcus*	共有
15	卷曲乳杆菌 *Lactobacillus crispatus*	NR_119274	99	厚壁菌门 Firmicutes 芽孢杆菌纲 Bacilli 乳杆菌属 *Lactobacillus*	SUC 组 1-1、1-3，STA 组，RAF 组，SBO 组和对照组 5-3 共有
17	芬戈尔德别样杆菌 *Alistipes finegoldii*	NR_115300	99	拟杆菌门 Bacteroidetes 拟杆菌纲 Bacteroidia 别样杆菌属 *Alistipes*	SBO 组 4-1、4-3 和对照组 5-2、5-3 共有
20	肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae*	NR_041750	99	变形菌门 Proteobacteria 加玛变形菌纲 Gammaproteobacteria 克雷伯菌属 *Klebsiella*	共有
22	弗格森埃希氏菌 *Escherichia fergusonii*	NR_074902	100	变形菌门 Proteobacteria 加玛变形菌纲 Gammaproteobacteria 埃希氏菌属 *Escherichia*	SUC 组，STA 组，RAF 组，SBO 组和对照组 5-2、5-3 共有
25	菊花迪克氏菌 *Dickeya chrysanthemi*	NR_117738	99	变形菌门 Proteobacteria 加玛变形菌纲 Gammaproteobacteria 迪克氏菌属 *Dickeya*	共有
26	宋内氏志贺氏菌 *Shigella sonnei*	NR_104826	99	变形菌门 Proteobacteria 加玛变形菌纲 Gammaproteobacteria 志贺氏菌属 *Shigella*	共有
28	路氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri*	NR_075036	100	厚壁菌门 Firmicutes 芽孢杆菌纲 Bacilli 乳杆菌属 *Lactobacillus*	SUC、STA、RAF 和 SBO 组共有
29	类肺炎克雷伯菌 *Klebsiella quasipneumoniae*	NR_134062	100	变形菌门 Proteobacteria 加玛变形菌纲 Gammaproteobacteria 克雷伯菌属 *Klebsiella*	SUC 组，STA 组，RAF 组，SBO 组 4-1、4-3 和对照组 5-3 共有

2.4 发酵液粪臭素浓度、发酵参数与菌群多样性间的相关关系

由表 5 可知，发酵液乙酸浓度与菌群多样性指数、丰富度均呈正相关，其中乙酸浓度与菌群多样性指数呈极显著正相关（r=0.964，P<0.01），乙酸浓度与菌群丰富度呈显著正相关（r=0.954，P<0.05）；pH 与菌群均匀度呈显著正相关（r=0.909，P<0.05）。

表 5　发酵液粪臭素浓度、发酵参数与肉仔鸡盲肠菌群多样性间的相关关系

Table 5　Correlation of skatole concentration, fermentation parameters and diversity of cecal microbiota in fermentation broth of broilers

项目 Items	多样性指数 Shannon-wiener index	均匀度 Evenness	丰富度 Richness
吲哚 Indole/(ng/mL)	－0.228	0.659	－0.295
粪臭素 Skatole/(ng/mL)	－0.788	0.866	－0.845
乙酸 Acetate/(mmol/L)	0.964**	－0.521	0.954*
乳酸 Lactate/(mmol/L)	0.143	0.041	0.102
pH	－0.477	0.909*	－0.564
累积产气量 Cumulative gas production/mL	0.367	－0.619	0.411

**表示极显著相关（*P*<0.01），*表示显著相关（*P*<0.05）。

** means extremely significant correlation (*P*<0.01), * means significant correlation (*P*<0.05).

3 讨 论

3.1 大豆低聚糖及其功能组分在肉仔鸡盲肠菌群作用下对 *L*-Try 代谢生成粪臭素的影响

发酵底物和微生物种类对发酵过程中产气量、产气速率及代谢产物都有一定的影响[16]。Lan 等[17]以 81 日龄肉仔鸡盲肠菌群为接种物，体外发酵试验结果表明，与 SBO 和 RAF 相比，STA 具有较大的产气量和产气速率。本试验结果表明，SUC、STA、SBO 组发酵液 24 h 累积产气量极显著高于对照组，但 3 组间差异不显著。说明肉仔鸡盲肠微生物能够很好地利用 SBO 及其功能组分（RAF 除外）进行发酵，SUC、STA、SBO 均为肉仔鸡盲肠微生物很好的碳源。易中华等[18]以 42 日龄肉仔鸡盲肠内容物为菌源，体外发酵 RAF、STA、果寡糖和甘露寡糖，结果表明它们的可发酵性依次降低，且 RAF 发酵产气量最大、产气速率最快。本试验结果表明，RAF 产气量最小，这可能与本试验中添加了 *L*-Try 有关，由于蛋白质源的存在影响了碳水化合物的发酵。本试验中，在发酵 21 h 之前，RAF 组的累积产气量低于对照组，至发酵 24 h 累积产气量才超过对照组，说明 RAF 的发酵速度较慢，造成前期微生物依赖 *L*-Try 为发酵底物，使 *L*-Try 降解增加，进一步使吲哚和粪臭素产生量增加，尤其 RAF 组吲哚的产量比 SUC、STA 和 SBO 组分别高出 220.51、212.39 和 221.50 ng/mL。

Li 等[8]报道，添加甜菜粕和果寡糖显著降低了猪直肠菌群作用下 *L*-Try 培养液中粪臭素的浓度和相对产率。本试验表明，添加 SBO 及其功能组分显著降低了发酵液粪臭素浓度，其降低效果由高到低依次为 SBO、SUC、STA、RAF，添加 RAF 对发酵液吲哚浓度无显著影响。说明无论是 SBO，还是其功能组分都具有较好的降低发酵液粪臭素产量的效果，但 RAF 效果最差。主要是由于 RAF 发酵速度慢，导致微生物首先利用 *L*-Try，进而导致其分解产物的增加。研究表明，肠道微生物的生

长代谢活动需要碳水化合物和蛋白质参与，在肉仔鸡肠道远端，细菌糖化发酵优先，只有当碳水化合物用尽时，腐败作用才会出现[19]。SBO 及其功能组分降低粪臭素浓度的效果，主要是源于其作为微生物的能源物质优先发酵，进而减少了细菌对 *L*-Try 的发酵，因此减少了粪臭素的产生量。

非可消化碳水化合物（NDC）在结肠中通过微生物的发酵，最终产生乙酸、丙酸和丁酸[20]。因此，单胃动物肠道中乙酸、丙酸和丁酸的含量和比例可间接反映肠道微生物菌群状况[21]。Lan 等[22]以 81 日龄肉鸡盲肠内容物为菌源，体外发酵 SBO、大豆水溶性多糖等四种 NDC 以及 STA 和 RAF，结果表明 SBO 组发酵液具有最高的丁酸产量和最低的 pH、氨氮浓度（199.3 mg/L）。本试验中 SBO 及其功能组分对发酵液乙酸浓度无显著影响，但对照组乙酸浓度最低（10.27 mmol/L）。Macfarlane 等[23]报道，细菌发酵时所使用的底物会影响到短链脂肪酸（SCFA）的产量，一般以蛋白质为发酵底物所产生的 SCFA 量会比以碳水化合物为基质的少。本试验中，添加 SBO 极显著降低了发酵液乳酸浓度和 pH，对照组的 pH 最高，对照组和 RAF 组 pH 差异不显著。由于低 pH 环境有利于乳酸菌的增长，减少了腐败菌的滋生，进而达到减少粪臭素产生的效果。

本试验采用气相色谱法，未检测到发酵液中的丙酸和丁酸，易中华等[18]以肉仔鸡盲肠内容物为菌源，体外发酵 STA 和 RAF，测得 24 h 发酵液乙酸、丙酸和丁酸的摩尔比例分别为 5.6:2.5:1.9 和 5.6:2.3:2.1。说明肉仔鸡肠道微生物发酵碳水化合物主要产生乙酸和乳酸，而产生的丙酸和丁酸极少。

3.2 大豆低聚糖及其功能组分对体外条件下肉仔鸡盲肠菌群组成的影响

近年来，PCR-DGGE、qPCR、宏蛋白质组学等技术被广泛应用于动物肠道菌群生态学研究，已成为研究肉仔鸡肠道微生物的主要技术手段，并用于解释与恶臭化合物生成有关的新菌落[10-11]。本试验中，添加 SBO 及其功能组分后，对发酵液菌群多样性指数无显著影响，与侯瑞[11]报道的结果一致。但本试验中，添加 SBO 及其功能组分后显著提高了发酵液菌群的丰富度，SBO 组显著降低了发酵液菌群的均匀度。在体外培养体系中，菌群 PCR-DGGE 指纹图谱的差异，以及 STA、RAF、SBO 组与对照组相似性的差异，可能解释了 SBO 及其功能组分降低粪臭素产生的原因。另外，试验组有 3 条特异性条带，相似菌分别为延长布劳特氏菌、迪氏副拟杆菌、路氏乳杆菌，说明添加 SBO 及其功能组分能够通过促进以上细菌的增殖降低吲哚、粪臭素的产生。

3.3 发酵液粪臭素浓度、发酵参数与盲肠菌群组成的相关关系分析

已往的研究大多注重 SBO（或其部分组分）对人或动物肠道微生物菌群的影响，少量文献涉及对粪臭素产量、pH 和有机酸等的影响，有关它们之间相关关系的研究仅见零星报道[24-25]。通过研究

粪臭素、吲哚等浓度与肠道菌群间的相关关系，将有助于揭示 SBO 及其功能组分降低肉仔鸡粪臭素、吲哚等产生的微生物学机制，对探究降低粪臭素污染的营养调控措施具有重要科学意义。胡彩虹等[26]以猪粪为菌源体外发酵 *L*-Try，结果表明，pH 较高的环境有利于粪臭素的产生，而 pH 较低的环境有利于吲哚的产生。说明环境酸度与吲哚和粪臭素的产生量存在一定关系。王琪等[25]报道，42 日龄肉仔鸡排泄物 pH 与盲肠乳酸浓度呈显著负相关关系（r=–0.927）。本研究表明，添加 SBO 及其功能组分极显著影响肉仔鸡体外发酵液的乳酸浓度和 pH，其中 SBO 组 pH 最低，而对照组的 pH 最高。结合吲哚浓度、粪臭素浓度数据分析，与以上报道基本一致。另外产气量越高，菌群的发酵特性越好，越不利于 *L*-Try 降解产生吲哚。张沛[5]研究表明，肉仔鸡肠道菌群多样性指数、丰富度和总菌数量与粪臭素产量呈极显著正相关，r 分别为 0.748、0.783 和 0.700。本研究表明，发酵液的乙酸浓度与菌群多样性指数呈极显著正相关，乙酸浓度与菌群丰富度呈显著正相关，pH 与菌群均匀度呈显著正相关，而吲哚和粪臭素浓度与菌群结构无显著相关性。因此，本试验中也可能是由于 SBO 及其功能组分通过增加或降低某些菌群的数量来降低粪臭素的产生，待后续试验报道。另外，此结果是否与肉仔鸡肠道内菌群的变化一致，还需动物试验进一步验证。

4 结 论

① 添加 1%的 SBO、SUC 和 STA 极显著降低了肉仔鸡体外盲肠发酵液吲哚浓度，降低幅度分别为 98.15%、97.72%和 94.17%；添加 1%的 SBO、SUC、STA 和 RAF 显著降低了发酵液粪臭素浓度，降低幅度分别为 79.04%、71.88%、70.28%和 62.42%。

② 添加 1%的 SBO 显著降低了发酵液菌群均匀度，添加 1%的 SBO 及其功能组分显著提高了发酵液菌群丰富度。SBO 及其功能组分促进了延长布劳特氏菌、迪氏副拟杆菌、路氏乳杆菌细菌的增殖。

参考文献：

[1] 刘国华,蔡辉益,常文环,等.肉鸡环保型日粮生产与应用技术研究进展[J].中国家禽,2015,37(4):40-42.

[2] BEIER R C,ANDERSON R C,KRUEGER N A,et al.Effect of nitroethane and nitroethanol on the production of indole and 3-methylindole (skatole) from bacteria in swine feces by gas chromatography[J].Journal of Environmental Science and Health Part B,2009,44(6):613-620.

[3] JENSEN R L.Feed interventions and skatole deposition[D].Copenhagen,Denmark:University of Co-

penhagen,2012:1–18.

[4] ZAMARATSKAIA G,SQUIRES E J.Biochemical,nutritional and genetic effects on boar taint in entire male pigs[J].Animal,2009,3(11):1508–1521.

[5] 张沛.肉仔鸡粪臭素产生的基本规律及与肠道微生物组成的变化关系研究[D].硕士学位论文.沈阳:沈阳农业大学,2016.

[6] 胥九兵,刘海玉,李克文,等.高纯度功能性低聚糖的生产及应用[J].精细与专用化学品,2013,21(4):10–12.

[7] COON C N,LESKE K L,AKAVANICHAN O,et al.Effect of oligosaccharide-free soybean meal on true metabolizable energy and fiber digestion in adult roosters[J].Poultry Science,1990,69(5):787–793.

[8] LI C Y,LIU J X,WANG Y Z,et al.Influence of differing carbohydrate sources on *L*-tryptophan metabolism by porcine fecal microbiota studied *in vitro*[J].Livestock Science,2009,120(1/2):43–50.

[9] 盛清凯,成建国,赵红波,等.外源 *L*-色氨酸、果聚糖、酪蛋白对猪粪发酵液粪臭素浓度的影响[J].动物营养学报,2014,26(9):2797–2804.

[10] YANG G Q,YIN Y,LIU H Y,et al.Effects of dietary oligosaccharide supplementation on growth performance,concentrations of the major odor-causing compounds in excreta,and the cecal microflora of broilers[J].Poultry Science,2016,95(10):2342–2351.

[11] 侯瑞.菊糖和大豆寡糖对体外条件下肉仔鸡粪臭素产量及肠道菌群的影响[D].硕士学位论文.沈阳:沈阳农业大学,2015.

[12] 姚立虎,徐茜.蒽酮比色法测食品总糖含量的简化研究[J].食品工业,1992(3):40–42.

[13] YOKOYAMA M T,CARLSON J R.Dissimilation of tryptophan and related indolic compounds by ruminal microorganisms *in vitro*[J].Applied Microbiology,1974,27(3):540–548.

[14] ALAM M J,JEONG C D,MAMUAD L L,et al.Bacterial community dynamics during swine *in vitro* fermentation using starch as a substrate with different feed additives for odor reduction[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2012,25(5):690–700.

[15] 赵兴涛,徐桂转,刘杰博,等.气相色谱法测定厌氧发酵液中挥发性脂肪酸的研究[J].河南农业大学学报,2013,47(5):584–586,591.

[16] JENSEN B B,JØRGENSEN H.Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas pro-

duction in various regions of the gastrointestinal tract of pigs[J].Applied and Environmental Microbiology,1994,60(6):1897–1904.

[17] LAN Y,WILLIAMS B A,VERSTEGEN M W A,et al.Soy oligosaccharides *in vitro* fermentation characteristics and its effect on caecal microorganisms of young broiler chickens[J].Animal Feed Science and Technology,2007,133(3/4):286–297.

[18] 易中华,朱年华,黎观红,等.肉仔鸡盲肠微生物体外发酵 NDO 和 NSP 的比较研究[J].江西农业大学学报,2012,34(2):345–350.

[19] APAJALAHTI J,VIENOLA K.Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion[J].Animal Feed Science and Technology,2016,221:323–330.

[20] TREMAROLI V,BÄCKHED F.Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism[J].Nature,2012,489(7415):242–249.

[21] 马曦,韩萌,李德发.猪肠道微生物代谢与思考[C]//中国畜牧兽医学会动物营养学分会第十二次动物营养学术研讨会论文集.北京:中国农业大学出版社,2016:3–14.

[22] LAN Y,WILLIAMS B A,TAMMINGA S,et al.*In vitro* fermentation kinetics of some non-digestible carbohydrates by the caecal microbial community of broilers[J].Animal Feed Science and Technology,2005,123–124:687–702.

[23] MACFARLANE G T,ALLISON C,GIBSON S A W,et al.Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine[J].Journal of Applied Bacteriology,1998,64(1):37–46.

[24] HAYAKAWA K,MIZUTANI J,WADA K,et al.Effects of soybean oligosaccharides on human faecal flora[J].Microbial Ecology in Health and Disease,1990,3(6):293–303.

[25] 王琪,管倩偶,杨桂芹,等.饲粮添加菊糖对肉仔鸡生长性能、排泄物及肠道主要臭气化合物浓度的影响[J].动物营养学报,2016,28(12):3875–3884.

[26] 胡彩虹,俞颂东,许梓荣.猪粪便细菌群作用下 3–甲基吲哚(粪臭素)和吲哚形成的研究[J].中国畜牧杂志,2002,38(5):10–11.

Effects of Soybean Oligosaccharide and Its Functional Components on Skatole Production and Microbiota Composition of Broilers Cecal Contents *in Vitro*

Author, YANG Guiqin, professor, E-mail: guiqiny@126.com (责任编辑 李慧英)

YANG Guiqin YANG Hang LIU Jizhe LIU Haiying DONG Weiguo ZHU Xin

(*College of Animal Husbandry and Veterinary, Shenyang Agricultural University, Shenyang* 110866*, China*)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of soybean oligosaccharide (SBO) and its functional components on skatole production and microbiota composition of broilers cecal contents *in vitro*. This experiment used a single-factor completely randomized design, the 42 days of age broiler cecal contents was used as bacterial source, and the anaerobic culture medium was divided into sterile culture bottles, and divided into 5 groups with 3 replicates per group. The control group was added 250 μmol/L *L*-tryptophan, sucrose (SUC), stachyose (STA), raffinose (RAF) and SBO groups were supplemented with 1% SUC, STA, RAF and SBO on the basis of control group, respectively. In addition, each group also had a blank control group which *L*-tryptophan was absent and the other components were the same. Microbial suspensions were anaerobically incubated at 39 ℃ for 24 h using ANKOM RFS gas production system *in vitro*. The results showed as follows: 1) the 24 h cumulative gas production in fermentation broth in SUC, STA and SBO groups was significantly higher than that in control and RAF groups ($P<0.01$). Compared with the control group, the indole concentration in fermentation broth in SBO, SUC, and STA groups was significantly reduced by 98.15%, 97.72% and 94.17%, respectively ($P<0.01$), and the skatole concentration was significantly reduced by 79.04%, 71.88%, 70.28%, respectively ($P<0.05$). The lactate concentration in fermentation broth in SUC group was significantly higher than that in the other groups ($P<0.01$), and pH in the control group was significantly higher than that in the other groups except for the RAF group ($P<0.01$). 2) The microbiota composition in fermentation broth were analyzed by PCR-denatured gradient gel electrophoresis (DGGE), the results showed that the microbiota evenness in fermentation broth in SBO group was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$), and the microbiota richness in SUC, STA, RAF and SBO groups was significantly higher than that in control group ($P<0.05$). The microbiota similarity in fermentation broth in SBO, STA and RAF groups was higher than that in control group. Three specific bands were present only in experimental groups, the similar strain were *Blautia producta*, *Parabacteroides distasonis*, and *Lactobacillus reuteri*, respectively. In conclusion, under the present experimental condition, addition 1% SUC, STA, and SBO in broiler cecal contents culture medium significantly de-

creases the concentrations of indole and skatole by metabolism of *L*-tryptophan, improves the microbiota richness, and promotes the proliferation of specific bacteria. The effects of skatole reduction are as follows: SBO>SUC>STA.

Key words: skatole; soybean oligosaccharide; cecal microbiota; fermentation *in vitro*; broilers